

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

**Charakterisierung von temperatursensitiven
Mutanten des Virus der Klassischen Geflügelpest**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Schaker Schukre Schubaers
Tierarzt aus Khanyuniß, Palästina

Gießen 1974

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

**Charakterisierung von temperatursensitiven
Mutanten des Virus der Klassischen Geflügelpest**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Schaker Schukre Schubaers
Tierarzt aus Khanyuniß, Palästina

Gießen 1974

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
in Gießen

Dekan: Professor Dr. M. Frimmer

Berichterstatter: Professor Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 23.9.74

I. Einleitung

II. Die Bedeutung der Geschichte der Philosophie

1. Einleitung

2. Die Philosophie

III. Die Philosophie der Antike

1. Die Philosophie der Antike

2. Die Philosophie der Antike

3. Die Philosophie der Antike

4. Die Philosophie der Antike

Meinen Eltern, Dr. R. Rott und Dr. C. Scholtissek

in Verehrung und Dankbarkeit zugeeignet

4. Die Philosophie der Antike

5. Die Philosophie der Antike

6. Die Philosophie der Antike

7. Die Philosophie der Antike

8. Die Philosophie der Antike

9. Die Philosophie der Antike

10. Die Philosophie der Antike

11. Die Philosophie der Antike

12. Die Philosophie der Antike

13. Die Philosophie der Antike

14. Die Philosophie der Antike

15. Die Philosophie der Antike

16. Die Philosophie der Antike

17. Die Philosophie der Antike

18. Die Philosophie der Antike

19. Die Philosophie der Antike

20. Die Philosophie der Antike

21. Die Philosophie der Antike

22. Die Philosophie der Antike

23. Die Philosophie der Antike

24. Die Philosophie der Antike

25. Die Philosophie der Antike



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Struktur und Vermehrung der Orthomyxoviren	4
1. Struktur	4
2. Vermehrung	6
III. Mutationen durch 5-Fluoruracil-Behandlung	10
1. Mutagene Wirkung des Fluoruracils	10
2. Isolierung von temperatursensitiven Mutanten des Virus der Klassischen Geflügelpest mit Hilfe von 5-Fluoruracil	11
IV. Material und Methoden	13
1. Virusstämme	13
2. Virusvermehrung	13
3. Plaquetest	15
4. Hämagglutinationsreaktion	16
5. Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität	17
6. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	17
7. Radioaktive Markierung von Virus-Proteinen	20
8. Medien und Lösungen	21
V. Untersuchungsergebnisse	26
1. Bestimmung der Reversionshäufigkeit der ts-Mutanten	26
2. Hitze-Stabilität der ts-Mutanten	28
3. Vermehrungskinetik der ts-Mutanten	30
4. Virusvermehrung unter Temperatursprung-Bedingungen	31
5. Bildung von Virus-Polypeptiden bei verschiedenen Temperaturen	46
6. Plaquebildung in verschiedenen Wirtszellen	51
7. Veränderung der Färbebedingungen für den Plaquetest	52

VI.	Besprechung der Ergebnisse	57
VII.	Zusammenfassung und Bewertung des Ordens	60
VIII.	Literaturverzeichnis	61
	Lebenslauf	
IX.	Einleitung	
	1. Aufgabenstellung	
	2. Bedeutung des Problems	
	3. Aufbau des Buches	
X.	Grundlagen der Virologie	
	1. Definitionen	
	2. Historie der Virologie	
	3. Klassifizierung der Viren	
	4. Struktur der Viren	
	5. Vermehrung der Viren	
	6. Pathogenität der Viren	
	7. Diagnostik der Viren	
	8. Prävention der Viren	
XI.	Methoden der Virologie	
	1. Kultivierungsmethoden	
	2. Isolierungsmethoden	
	3. Identifizierungsmethoden	
	4. Quantifizierungsmethoden	
	5. Elektronenmikroskopie	
	6. Immunologische Methoden	
	7. Molekularbiologische Methoden	
	8. Biochemische Methoden	
XII.	Pathogenität und Immunogenität	
	1. Pathogenität	
	2. Immunogenität	
XIII.	Prävention und Therapie	
	1. Prävention	
	2. Therapie	
XIV.	Zusammenfassung	
XV.	Literaturverzeichnis	
XVI.	Lebenslauf	

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Wie bei Bakterien sind seit Jahren auch bei Viren Mutanten bekannt, die sich bei relativ niederen Temperaturen (z.B. 33°C) wie ihre Wildtypen vermehren, bei höheren Temperaturen (z.B. 40°C) im Gegensatz zu diesen dazu jedoch nicht mehr fähig sind. Derartige temperatursensitive Mutanten (ts-Mutanten) können in seltenen Fällen spontan auftreten, lassen sich aber in relativ guter Ausbeute mit Hilfe mutagener Substanzen und Bebrüten bei verschiedenen Temperaturen isolieren. Die Temperatursensitivität kann dabei in verschiedenen lebenswichtigen Funktionen der Zelle oder des Virus begründet sein, d.h. daß die Veränderung verschiedener Gene oder Genprodukte eine derartige Temperaturempfindlichkeit bedingt (vergl. Bresch u. Hausmann, 1972).

Die ts-Mutanten haben sich als sehr wichtige Hilfsmittel zur Aufklärung von Stoffwechsel- und Replikationsvorgängen erwiesen, da man mit ihrer Hilfe derartige Vorgänge unterbrechen kann, ohne in diese unphysiologisch eingreifen zu müssen.

Es hat sich weiterhin gezeigt, daß ts-Mutanten von Viren weitgehend ihre Pathogenität eingebüßt haben, obwohl sie, wenigstens zum Teil, in ihrem Wirtstier die Bildung von spezifischen Antikörpern induzieren. Sie würden sich somit zur Verwendung als Lebendvakzinen

hervorragend eignen, indem sie sich bei physiologischer Körpertemperatur noch geringgradig vermehren und damit die Antikörperproduktion gegen alle virusspezifischen Antigene stimulieren, bei erhöhter Temperatur (Fieber) sich jedoch nicht mehr replizieren können. Da in der Temperatursensitivität überdies ein relativ leicht zu testender Marker für die Pathogenität zur Verfügung steht, ist die Selektion solcher apathogener Viren nicht zu schwierig (Miles u. Chanock, 1971).

Temperatursensitive Mutanten von Orthomyxoviren, zu denen das Virus der Klassischen Geflügelpest (KP-Virus) aufgrund seiner strukturellen und biochemischen Eigenschaften gerechnet wird, konnten bereits in verschiedenen Laboratorien isoliert werden (Simpson u. Hirst, 1968; Mackenzie, 1970; Miles u. Chanock, 1971; Sugiura et al., 1972; Ghendon et al., 1973; Scholtissek et al., 1974). Die Temperatursensitivität dieser Mutanten war durch Veränderung verschiedener Virus-Aktivitäten bedingt.

In dieser Arbeit wurden 2 weitere ts-Mutanten des KP-Virus charakterisiert, die im Institut für Virologie der Justus Liebig-Universität isoliert wurden (C. Scholtissek). Es soll dabei der Schritt während der Virusvermehrung bestimmt werden, der bei der nicht-permissiven

Temperatur nicht mehr möglich ist. Weiterhin sollte die Eignung dieser ts-Mutanten als Lebendvakzine geprüft werden.

II. STRUKTUR UND VERMEHRUNG DER ORTHOMYXOVIREN

1. Struktur

Die Orthomyxoviren gehören zu den komplex aufgebauten animalen Viren (Rott, 1974). Ihr helikal strukturiertes Nucleokapsid ist Träger des genetischen Materials der Viruspartikel sowie eines gruppenspezifischen Antigens, dem RNP-Antigen. Die Virus-RNS hat ein Molekulargewicht von etwa 3×10^6 . Sie besteht jedoch nicht wie bei den meisten anderen RNS-haltigen Viren aus einem einzigen durchgehenden Strang, sondern liegt - zumindest nach der üblichen Extraktion - in 6 - 8 Stücken vor. Diese besondere Struktur der Virus-RNS macht einige biologische Besonderheiten der Orthomyxoviren, wie z.B. ihre hohe Rekombinationsfähigkeit, erklärlich. Der Proteinanteil des Nucleokapsids ist aus einheitlichen Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von etwa 60 000 zusammengesetzt. Eng assoziiert damit scheint die virusspezifische RNS-abhängige RNS-Polymerase zu sein, über deren physikalische Eigenschaften noch wenig bekannt ist (Schwarz u. Scholtissek, 1973). Das Nucleokapsid ist von einer Außenhülle (Envelope) umgeben, deren Grundlage ein von der Wirtszelle übernommener Lipid-Bilayer darstellt. Das Envelope wird innen von einer Proteinschicht ausgekleidet (M-Protein), die ebenfalls ein gruppenspezifisches Antigen dar-

stellt und deren lipophiles Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 26 000 besitzt. Aus der Außenhülle ragen feinste stachelartige Gebilde heraus, die hämagglutinierende und Neuraminidase-Aktivitäten besitzen. Sie sind Glycoproteide. Das Virus-Hämagglutinin, das die für die Virusadsorption an Zelloberflächen entscheidende Struktur ist und die immunogene Komponente des Virions trägt, besteht aus zwei Glycoproteiden mit einem Molekulargewicht von 50 000 und zwei Glycoproteiden mit einem Molekulargewicht von 32 000, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Sie entstehen durch Spaltung eines Vorläufer-Glycoproteides, das als HA bezeichnet wird (Klenk u. Rott, 1973). Die Neuraminidase, die ein Molekulargewicht von etwa 200 000 besitzt, scheint aus vier gleichartigen Untereinheiten zusammengesetzt zu sein. Das Enzym spaltet die α -ketosidische Bindung zwischen der Neuraminsäure und einem anderen Zucker. Im Gegensatz zur Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (RDE), die 2'→3'-, 2'→4'-, 2'→6'- und 2'→8'-Bindungen hydrolysiert, spaltet das Enzym der Orthomyxoviren nur 2'→3'-Bindungen (Drzeniek, 1972; Huang u. Orlich, 1972). Die Rolle des Virus-Enzyms während der Virusinfektion ist noch offen (s. unten).

2. Vermehrung

Wird den Viruspartikeln Gelegenheit gegeben, mit geeigneten Wirtszellen in Kontakt zu treten, heften sie sich zunächst an spezifische Zellrezeptoren an (zusammenfassende Darstellung: Scholtissek et al., 1969). Die Ansicht, daß bei der Adsorption der Viruspartikel der Neuraminidase eine entscheidende Rolle zukommt in der Art, daß es zwischen den neuraminsäurehaltigen Zellrezeptoren der Zelloberfläche und der Virus-Neuraminidase zu einer Enzym-Substrat-Bindung kommt, ist in letzter Zeit ins Wanken geraten. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß eine Hemmung der Enzym-Aktivität durch spezifische Antisera die Infektiosität des Virus nicht beeinflusst (Seto u. Rott, 1966). Das Virus-Enzym wird auch nicht in signifikanten Mengen an Zelloberflächen gebunden (Drzeniek et al., 1966). Demgegenüber besteht kein Zweifel darüber, daß die mit Zelloberflächen reagierende Viruskomponente am Hämagglutinin lokalisiert ist. Das Hämagglutinin reagiert in Form einer elektrostatischen Bindung mit der Neuraminsäure der Zellrezeptoren (Huang et al., 1973).

Bald nach dem Anheften an die Zellen gehen drastische Veränderungen mit dem Virusteilchen vor sich. Es tritt in eine als Eklipse bezeichnete Phase ein, in der seine infektiöse Eigenschaft mit den üblichen virologischen

Methoden nicht mehr nachzuweisen ist. Alle Hinweise, über die wir in dieser Richtung verfügen, machen es wahrscheinlich, daß zu dieser Zeit das Virus seiner Hülle entkleidet und dadurch das Nucleokapsid freigelegt wird. Es ist noch weitgehend unverstanden, wo und wie dieser Schritt abläuft.

Die virale RNS-Synthese beginnt etwa 1 Stunde nach der Infektion und steigt bis 3 Stunden p.i. (post infektionem) exponentiell an. Danach nimmt die Syntheserate wieder ab. Folgender Mechanismus der Replikation gilt als wahrscheinlich: Am viralen RNS-Strang synthetisiert die RNS-abhängige RNS-Polymerase, die aus dem Viruspartikel stammen kann oder als sog. Frühprotein synthetisiert wird, komplementäre RNS. Die Synthese läuft vom 5'-Ende zum 3'-Ende. Die fertigen komplementären Stränge verlassen ihre Matrizen und wandern entweder an die Ribosomen, wonach an ihnen gemäß ihrer Tripletstruktur die Polypeptidketten der Virusproteine synthetisiert werden, oder es werden an ihnen virale RNS-Stränge gebildet. Die Synthese der komplementären RNS läuft der viralen RNS-Synthese voraus (Scholtissek u. Rott, 1970). Die Polymerase-Aktivität ist etwa 1,5 - 2 Stunden nach der Infektion in der Mikrosomenfraktion nachweisbar und steigt während des ganzen Infektionszyklus fast linear an. Die Rate der Polymerase-Synthese ähnelt der der viralen RNS-Synthese in vivo

(Scholtissek u. Rott, 1969). In vitro wird von dem Enzym zwischen 85 und 100% komplementärer Strang synthetisiert (Scholtissek, 1969), während in vivo die virale RNS-Synthese vorherrscht.

Es ist noch unbekannt, inwieweit die zelluläre DNS für die Synthese der Virus-RNS notwendig ist. Für eine Beteiligung der Zell-DNS an der Virus-Synthese spricht die Tatsache, daß Substanzen, die die DNS-abhängige RNS-Synthese blockieren, auch die Bildung der Orthomyxoviren in vivo hemmen.

Die neugebildete Virus-RNS konnte bislang nicht in freier Form isoliert werden. Das bedeutet, daß gleichzeitig mit ihrer Synthese auch die Bildung der Virus-Proteine beginnt. Das gilt für das Protein des Nucleokapsids sowie der Neuraminidase und des Hämagglutinins (Scholtissek u. Rott, 1961). Wie neuere Untersuchungen wahrscheinlich machen, wird das M-Protein etwas später synthetisiert (Skehel, 1973). Die Glykosylierung des Hämagglutinins und der Neuraminidase erfolgt während der entsprechenden Polypeptid-Synthese im rauen endoplasmatischen Retikulum (Klenk et al., 1974).

Nach ihrer Bildung werden die Virusstruktur-Proteine zur Zellmembran transportiert, wo sie zu den infektiösen Viruspartikeln zusammengebaut werden. Dabei wird die Zell-

membran spezifisch verändert, was durch die HämadSORption und die Agglutinierbarkeit der infizierten Zellen durch Concanavalin A zum Ausdruck kommt (s. Rott et al., 1972). Die neugebildeten Viruspartikel werden schließlich über Zellprotrusionen ausgeschleust. Die ersten neugebildeten infektiösen Viruspartikel lassen sich bei physiologischen Temperaturen 4 Stunden p.i. feststellen. Das Maximum der Virusvermehrung ist nach 8 Stunden p.i. erreicht. Etwa 20 Stunden nach der Infektion stirbt die infizierte Zelle ab. Pro Zelle werden etwa 500 infektiöse Viruspartikel synthetisiert (Lit. s. Scholtissek et al., 1969).

III. MUTATIONEN DURCH 5-FLUORURACIL-BEHANDLUNG

1. Mutagene Wirkung des Fluoruracils

Im 5-Fluoruracil (FU) ist das Wasserstoffatom des Uracils (U) am Kohlenstoffatom 5 durch Fluor ersetzt. Da die sterische Konfiguration des neuen Moleküls durch die etwas größere Elektronenhülle des Fluors nicht wesentlich verändert wird, kann FU bei der Replikation von RNA in den neuen Strang fälschlich für U eingebaut werden. Das Fluor hat allerdings eine viel höhere Elektronegativität als der Wasserstoff. Dadurch kann das tautomere Gleichgewicht am C 4, das im U in wässriger Lösung weitgehend auf der Seite der Ketoform liegt, in Richtung Enolform verschoben werden. Die Enolform des FU paart aber nicht mehr mit Adenin, sondern mit Guanin. Das bedeutet, daß an den entsprechenden Stellen nun auch ab und zu Guanosin-Nucleotide anstelle von Adenosin-Nucleotiden eingebaut werden. Bei einer weiteren Replikation paart nun mit dem falschen Guanin im Komplementärstrang ganz normal Cytosin, so daß in der Mutante an bestimmten Stellen des RNS-Moleküls anstelle des Uracils jetzt Cytosin steht.

FU kann sich jedoch auch in der Enolform bei der Virus-RNS-Vermehrung an Guanin anlagern und fälschlicherweise für Cytosin in den Komplementärstrang eingebaut werden.

Dient der so veränderte komplementäre Strang jetzt wieder als Matrize für neue virale Stränge, so kann es bei der Strangtrennung zu einer intramolekularen Umlagerung in die Ketoform kommen, an die jetzt regelmäßig Adenin angelagert wird.

FU macht also bei der RNS-Replikation Transitionen zwischen U und C und zwischen G und A (s. Bresch u. Hausmann, 1972).

2. Isolierung von temperatursensitiven Mutanten des Virus der Klassischen Geflügelpest mit Hilfe von 5-Fluoruracil

Zur Isolierung von temperatursensitiven Mutanten des Virus der Klassischen Geflügelpest mit Hilfe von 5-Fluoruracil wurden Primärkulturen von Hühnerfibroblasten (Schalendurchmesser 9 cm) mit dem KP-Stamm "Rostock" 145 in einer Multiplizität von weniger als einem Viruspartikel pro Zelle infiziert und mit 6 ml Lavit, das als Mutagen 5-Fluoruracil in Konzentrationen von 1, 2 und 3 mM enthielt, belegt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 33° C wurde mit dem infektiösen Kulturüberstand ein Plaquetest bei 33° C durchgeführt und die nach 48 - 72 Stunden auftretenden Plaques in ihrer Größe und Gestalt auf dem Schalenboden markiert. Dann wurden die markierten Kulturen für weitere 30 Stunden bei 40° C weiterinkubiert. Plaques, die nach dieser Zeit

nicht weitergewachsen waren, wurden mit sterilen Pasteur-Pipetten ausgestochen, in 2 ml einer 1%igen Rinderserum-albuminlösung gebracht und damit eine weitere Plaque-Passage durchgeführt. Diese weitere Plaque-Passage diente zur Reinigung des Virus und wurde entsprechend der ersten durchgeführt. Mit den vom 2. bzw. 3. Plaquetest isolierten Plaques wurden embryonierte Hühnereier infiziert und bei 33° C 48 Stunden weiterbebrütet. Die gewonnenen Eiflüssigkeiten wurden bei -80° C bis zur weiteren Verwendung eingefroren (Simpson u. Hirst, 1968; Scholtissek et al., 1974).

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Virusstämme

Das KP-Virus, Stamm "Rostock", Plaque-Mutante 145 (KP-145) diente als Wildtyp. Von ihm aus wurden die temperatursensitiven Mutanten gewonnen. Das Virus vermehrt sich bei 33, 37 und 40° C und produziert dabei mindestens 10^6 plaquebildende Einheiten (PBE) pro ml.

Die in dieser Versuchsreihe verwendeten temperatursensitiven Mutanten des KP-Virus F 18/4 und F 30/1 wurden mir von Herrn Prof. Dr. C. Scholtissek zur Verfügung gestellt. Sie wurden, wie vorne beschrieben, durch Fluoruracil-Behandlung gewonnen.

2. Virusvermehrung

Die verwendeten KP-Virusstämme wurden im embryonierten Hühnerei oder in der Gewebekultur zur Vermehrung gebracht.

Für die Vermehrung im embryonierten Hühnerei wurden 11 Tage vorbebrütete befruchtete Eier verwendet. Zur Infektion wurde virushaltiges Material, das jeweils von einem frisch gestochenen Plaque stammte, vom stumpfen Pol in das Zentrum des Eies appliziert und anschließend zur weiteren

Inkubation in einen Brutschrank verbracht. Eier, die mit dem Wildtyp infiziert waren, wurden bei 37° C 24 Stunden lang gehalten. Eier, die mit den Mutanten infiziert waren, verblieben für 48 Stunden bei 33° C. Danach wurden die Eiflüssigkeiten (Amnion- und Allantoisflüssigkeit) in der üblichen Weise entnommen.

Um auszuschließen, daß Revertanten der Mutanten zum Wildtyp in den Eiflüssigkeiten überhand nehmen, wurde nach spätestens zwei Ei-Passagen ein Reinigungs-Plaquetest eingeschoben. Dieser wurde, wie bereits beschrieben, bei 33 und 40° C durchgeführt.

Für die Vermehrung des Virus in Gewebekulturen wurden 48 Stunden alte Einschichtkulturen primärer embryonaler Hühnerzellen verwendet, die nach der von Kraus und Schäfer (1963) beschriebenen Methode angelegt wurden. Die Zellen wurden entweder in Kunststoff-Petrischalen (Greiner, Nürtingen), die einen Durchmesser von 5 cm haben, oder in Glaszählgefäßen für den Szintillationszähler (Packard), Durchmesser 2,5 cm, ausgesät. Die Zelldichte betrug 5×10^6 bzw. 3×10^6 Zellen pro ml. Nach 48 Stunden langer Bebrütung bei 37° C hatte sich ein dichter Zellrasen gebildet, der infiziert werden konnte.

Daneben wurden für bestimmte Versuche auch Zellkulturen aus Chorioallantoismembranen 11 Tage vorbebrüteter Hühner-eier verwendet. Zur Anlegung dieser Kulturen benutzten wir das von Cursiefen (Manuskript in Vorbereitung) ausgearbeitete Verfahren. Gewaschene Chorioallantoismembranen wurden mit einer Schere zerkleinert, in PBS aufgenommen und durch Stehenlassen sedimentiert. Auf 100 ml Sediment werden 500 ml einer 0,01%igen Hyaluronidase- und 0,01%igen Collagenase-Lösung (in Glucose-Kalium-Natrium-Puffer, pH 7,2) zugegeben und die Mischung 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Gewebesuspension wurde erneut sedimentiert, das Sediment in 500 ml 0,25%igem Trypsin aufgenommen und wiederum 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 1 000 UpM wurde das Sediment in ÄDTA-Puffer, pH 7,2, aufgenommen und einmal gewaschen. Von den so isolierten Zellen wurden 3×10^6 /ml in Kulturplatten (Durchmesser 5 cm) ausgesät. Als Medium diente Medium 199 (Serva, Heidelberg). Die Zellschicht war nach 2 Tagen geschlossen und konnte infiziert werden.

3. Plaquetest

Die Infektiosität wurde im Plaquetest bestimmt, der nach dem von Zimmermann und Schäfer (1960) angegebenen Verfahren durchgeführt wurde. Als Zellen dienten embryonale Hühnerzellen. Nach der Infektion und einer 30 Minuten

langen Adsorption wurden die Zellen mit agarhaltigem Medium überschichtet und entweder 72 Stunden bei 33° oder 48 Stunden bei 40° C im CO₂-durchströmten Brutschrank inkubiert. Pro Verdünnung wurden mindestens jeweils 2 Platten verwendet. Zur Berechnung der infektiösen Partikel (plaquebildende Einheiten, PBE) pro ml wird der Mittelwert der Plaques auf 1 ml Virussuspension hochgerechnet und mit dem negativen Logarithmus des Verdünnungstiters multipliziert.

4. Hämagglutinationsreaktion

Die Hämagglutination (HA)-Reaktion wurde nach der von Davenport et al. (1960) angegebenen Methode durchgeführt. Auf einer Plastiktüpfelplatte wurde die zu untersuchende Viruslösung nach Zweierpotenzen in 0,4 ml physiologischer Kochsalzlösung ausverdünnt. Hierzu wurden dann je 0,4 ml einer 1%igen Hühnerythrozyten-Suspension zugegeben. Die Platten wurden 45 Minuten bei Raumtemperatur gehalten und anschließend die Reaktion abgelesen.

Diejenige Virusverdünnung, bei der noch eine deutliche Agglutination erkennbar war, wurde als HA-Titer der Viruslösung angegeben.

5. Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität

Hierzu wurde die von Drzeniek et al. (1966) angegebene Methode verwendet. Das Virusmaterial wurde über Nacht gegen isotonen Phosphatpuffer, pH 7,2, bei 4° C dialysiert und in entsprechenden Verdünnungen mit Rinder-sialolactose 15 Minuten bei 37° C in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, inkubiert. Das Testvolumen betrug 0,5 ml, die Substratmenge 100 µg Sialolactose. Die freigesetzte N-Acetylneuraminsäure (NANS) wurde mit Hilfe des Thiobarbitursäuretestes nach Aminoff (1961) bestimmt. Die Enzym-Aktivität wird angegeben als die Menge an NANS, ausgedrückt in µg/0,5 ml Testvolumen, welche von 1 ml des dialysierten Virusmaterials in 15 Minuten unter den angegebenen Bedingungen abgespalten wird.

6. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Für die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese benutzten wir die von Caliguri et al. (1969) beschriebene Methode. Zur Herstellung des Gels wurden folgende Substanzen benötigt:

Phosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,2

SDS-Puffer (Sodium dodecyl sulfat, Na-Salz $C_{12}H_{25}OSO_3 \cdot Na$;
MG: 288,4, Serva, Heidelberg)

1 g SDS wurde in 1000 ml Phosphatpuffer gelöst.

Lösung A

bestehend aus:

20,0 Acrylamid (C_3H_5NO ; MG 71,1)

0,54 N,N'-Methylenbisacrylamid ($C_7H_{10}N_2O_2$; MG: 154,2)

ad 100,0 ml SDS-Puffer

Lösung B

sie wurde jeweils frisch angesetzt und bestand aus:

0,15 g Ammoniumpersulfat ($(NH_4)_2S_2O_8$), MG: 228,2

0,1 ml Tetramethyläthylendiamin = TMED ($C_6H_{16}N_2$;
MG: 116,2)

ad 100,0 ml SDS-Puffer.

Um ein zehnprozentiges Gel zu erhalten, wurden Lösung A und B zu gleichen Teilen gemischt. Die Mischung wurde mittels einer Pasteur-Pipette in das Gelröhrchen pipettiert. Oben auf das Gel wurden einige Tropfen der Lösung B gegeben. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 Minuten wurde die Lösung B wieder vom Gel genommen und durch Spacer-Gel ersetzt. Das Spacer-Gel hatte folgende Zusammensetzung:

3 Vol. SDS + 1 Vol. Lösung A + 8 Vol. Lösung B

Das Spacer-Gel benötigte zur Polymerisation eine Stunde. Danach kam das Gelröhrchen in den Vorlauf.

Die benutzten Röhrchen hatten einen Innendurchmesser von 4 mm und eine Länge von 10 cm. Die Anlage zur Halterung der Gele stammte von Shandon Ltd., London.

Beschickt wurden die Gele mit 100 μ des zu untersuchenden Materials, welches mit 10 μ Mercaptoäthanol (1 : 10 verdünnt mit Aqua bid.) und 10 μ 10%igem SDS versetzt war. Diese Mischung wurde 1 Minute im kochenden Wasserbad gehalten. Nach dem Abkühlen der Probe wurde ein Tropfen Glycerin und ein Tropfen Bromphenol-blau (4 mg/10 ml) hinzugegeben und das Ganze auf einem mechanischen Rüttler durchmischt.

Nach einer Laufzeit von 17 Stunden bei 30 Volt wurden die Gele aus den Röhrchen gedrückt und bei -20° C bis zur Auswertung gelagert.

Zum Schneiden der Gele wurden diese kurz vorher im Methanoleisbad gekühlt und dann mit einem Gelschneider in gleiche Scheibchen geschnitten. Die Scheibchen hatten eine Dicke von ungefähr 1 mm. Die Scheibchen wurden in Plastikröhrchen verbracht und mit 0,5 ml Soluene (Packard) überschichtet. Nach Verschluss der Röhrchen wurden sie etwa 2 Stunden lang bei 60° C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 2,5 ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit plus 1% Äthylenglycolmonoäthyläther hinzugefügt (Caliguiri et al., 1969).

Nach ausreichendem Vorkühlen der Proben wurden diese sodann in einem Packard-Liquid-Scintillation-Zählgerät gezählt.

7. Radioaktive Markierung von Virus-Proteinen

Für die radioaktive Markierung von Virusmaterial wurden den 24 Stunden alte embryonale Hühnerzellkulturen in Plastik-Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm zweimal mit warmem PBS gewaschen und in der üblichen Weise infiziert. Nach 30 Minuten Adsorptionszeit wurden die Zellrasen erneut zweimal mit warmem PBS gewaschen und bis zur 4. Stunde p.i., wie beschrieben, inkubiert. Danach wurde das jeweilige Medium durch radioaktiv markiertes Medium ersetzt. Diesem Medium war eine Mischung folgender Isotope zugesetzt worden:

L-(4,5- ³ H)Leucin	(spez. Aktivität 1,0 Ci/mmol)
L-(2,3- ³ H)Valin	(" " 1,5 Ci/mmol)
L-(3,5- ³ H)Tyrosin	(" " 1,0 Ci/mmol)

Die jeweils aufgegebene Menge der Aminosäuremischung betrug 10 µCi/ml.

Die Isotope stammten von "The Radiochemical Centre", Amersham, Buckinghamshire, England.

Das radioaktive Medium blieb für eine Stunde auf den Zellen. Danach wurde der Einbau durch zweimaliges Waschen des Zellrasens mit eiskaltem PBS gestoppt. Der Überstand wurde abgesaugt und 1 ml eiskaltes PBS auf die Zellen gegeben. Dann wurden die Zellen mit einem Gummischaber vom Schalenboden abgekratzt und in ein Spitzröhrchen überführt. Die Platten wurden nochmals mit 1 ml PBS gewaschen und die Flüssigkeit ebenfalls in das Spitzröhrchen verbracht. Nach 10 Minuten langer Zentrifugation bei 3 000 UpM wurde der Überstand dekantiert und das Sediment mit 1 ml PBS resuspendiert. Die suspendierten Zellen wurden mittels Ultraschall aufgebrochen und das Material, wie in "Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese" beschrieben, weiterverarbeitet (Klenk et al., 1972).

8. Medien und Lösungen

Lavit, 10-fach:

NaCl	720,00 g
KCl	40,00 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11,00 g
Glucose	450,00 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20,00 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20,00 g
Glutamin	5,00 g
Hefeextrakt	10,00 g

Penicillin	6,00 g
Streptomycin	5,00 g
Phenolrot	1,60 g
Vitamin B-Komplex	100,00 ml
Aqua bidest. ad	10 Liter

NaHCO_3 2,2% in Aqua bidest.

Lactalbumin-Hydrolysat (LaH) (Nutritional Biochemical Corporation (N.B.C.), Cleveland, Ohio, USA)

Lav_{it}, NaHCO_3 und LaH werden nach 10-facher Verdünnung gemischt.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

NaCl	100,00 g
KCl	2,50 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18,00 g
KH_2PO_4	2,50 g
Aqua bidest. ad	10 Liter
auf pH 7,2 eingestellt.	

Earle's Minimal Medium:

NaCl	72,00 g
KCl	4,00 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,10 g
Glucose	10,00 g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,00 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,00 g
NaHCO_3	11,00 g
Glutamin	2,90 g
Streptomycin	0,50 g
Penicillin	0,60 g
Phenolrot	0,16 g
Aqua bidest. ad	10 Liter

ADTA-Puffer:

Titriplex III	2,00 g
NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11,50 g
KH_2PO_4	0,20 g
Aqua bidest. ad	10 Liter
auf pH 7,2 eingestellt.	

GKN-Pufferlösung:

Glucose	10,00 g
NaCl	80,00 g
KCl	4,00 g
KH_2PO_4	0,60 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,602 g
Phenolrot	0,04 g
NaHCO_3	4,20 g
Aqua bidest. ad	10 Liter
auf pH 7,2 eingestellt.	

Trypsin, 10%ig

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,08 g
KH_2PO_4	0,06 g
Glucose	50,00 g
Trypsin	100,00 ml
Aqua bidest. ad	1 Liter

Wachstumsmedium:

1 Vol. Lavit, 10-fach
1 Vol. NaHCO_3 , 2,2%ig
1 Vol. LaH, 5%ig
7 Vol. bidest. H_2O
Kälberserum 10% v/v

Agarhaltiges-Medium:

1 Vol. Lavit, 10-fach

1 Vol. NaHCO_3 , 2,2%ig

1 Vol. LaH, 5%ig

2 Vol. bidest. H_2O

5 Vol. Agar in bidest. H_2O (1,4%ig)

V. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

1. Bestimmung der Reversionshäufigkeit der ts-Mutanten

Um festzustellen, wie stabil die ts-Mutanten F 18/4 und F 30/1 sind, wurden embryonierte Hühnereier mit jeweils einer Plaque-Suspension infiziert und die Eier anschließend für 48 Stunden bei 33° C gehalten. Die in den Eiflüssigkeiten enthaltenen infektiösen Partikel wurden im Plaquetest bei 33° und 40° C ermittelt. Die Zellen wurden 48 Stunden (40° C) bzw. 72 Stunden (33° C) nach der Infektion für 2 Stunden angefärbt und anschließend die Plaques ausgezählt.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist die Anzahl der bei 33° C gebildeten Plaques bei beiden ts-Mutanten ungefähr gleich und entspricht der des Wildtyps. Wurde der Plaquetest dagegen bei 40° C ausgeführt, so konnten bei den ts-Mutanten nur wenige PBE festgestellt werden. Das Verhältnis der gefundenen Plaques bei 33° und 40° C beträgt bei beiden ts-Mutanten 10^{5,65} und unterscheidet sich damit deutlich vom Wildtyp, bei dem bei 40° C etwa ebensoviel Plaques gebildet werden wie bei 33° C.

Die von den ts-Mutanten bei 33° C gebildeten Plaques unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Morphologie

Tabelle 1

Plauebildende Einheiten der ts-Mutanten und des Wildtyps bei 33 und 40° C

Virus	PBE/ml bei		
	33° C	40° C	Differenz PBE (40°C)/PBE (33°C)
F 30/1	$3,35 \times 10^7$	$7,5 \times 10^1$	$10^{5,65}$
F 18/4	$2,9 \times 10^7$	$7,5 \times 10^1$	$10^{5,65}$
KP-145 Wildtyp	$2,9 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	~ 1

Eiflüssigkeiten von Hühnereiern, die nach Infektion und Bebrütung bei 33° C erhalten worden waren, wurden im Plaque-test bei 33 bzw. 40° C auf Vorhandensein von infektiösem Virus untersucht:

von denen des Wildtyps. Sie sind klar und gleichmäßig rund und haben einen Durchmesser von etwa 2 mm. Die von den ts-Mutanten-Präparationen bei 40° C gebildeten Plaques haben die gleiche Morphologie wie der Wildtyp und werden mit der gleichen Geschwindigkeit gebildet. Es kann daher angenommen werden, daß sie vom Wildtyp gebildet werden und damit Revertanten der ts-Mutanten darstellen. Ihre Anzahl bei beiden ts-Mutanten hält sich jedoch in so engen Grenzen, daß ihr Auftreten bei einem Experiment, bei dem nur ein Vermehrungszyklus verfolgt wird, keine Rolle spielt.

2. Hitze-Stabilität der ts-Mutanten

Der Befund, daß die beiden ts-Mutanten F 30/1 und F 18/4 bei 40° C praktisch keine Plaques bilden, könnte darauf beruhen, daß ihre Infektiosität im Gegensatz zum Wildtyp sensitiv gegenüber höheren Temperaturen ist. Um das zu prüfen, wurden die ts-Mutanten bzw. den Wildtyp enthaltenden Eiflüssigkeiten im Verhältnis 1 : 3 mit Minimalmedium verdünnt, für verschieden lange Zeit bei 33° bzw. 40° C gehalten und anschließend die Infektiosität im Plaque-test bei 33° C bestimmt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt. Daraus geht hervor, daß die Temperaturstabilität bei 40° C

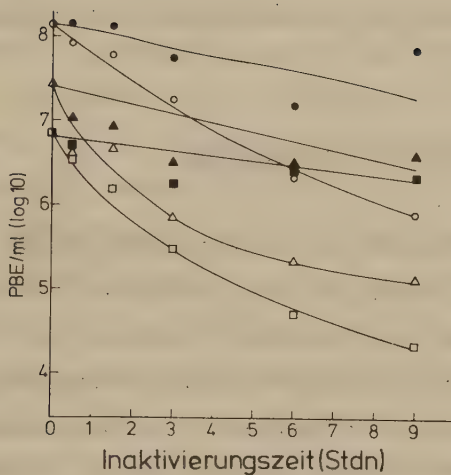


Abb. 1. Temperatur-Stabilität der ts-Mutanten F 18/4 und F 30/1 sowie des Wildtyps (KP-145).

Experimentelle Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen (Seite 28).

●—●, ○---○ Wildtyp 33 bzw. 40° C
 ▲—▲, △---△ F 18/4 33 bzw. 40° C
 ■—■, □---□ F 30/1 33 bzw. 40° C

aller 3 geprüften Virustypen prinzipiell gleich ist. Die ts-Mutante F 30/1 weist vielleicht eine etwas geringere Temperaturstabilität auf als der Wildtyp und die ts-Mutante F 18/4.

3. Vermehrungskinetik der ts-Mutanten

Um Informationen über die Charakteristik und die Geschwindigkeit der Vermehrung der ts-Mutanten zu erhalten, wurden Studien über die Einschnitt-Vermehrung bei 33° und 40° C durchgeführt. Dabei wurden Szintillationsröhrchen mit 0,2 ml infektiöser Eiflüssigkeit, wie beschrieben, infiziert. Die Infektionsmultiplizität betrug in jedem Falle mehr als 5 plaquebildende Einheiten pro Zelle. Damit war gewährleistet, daß jede Zelle infiziert war. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die Kulturen im Wasserbad mit einem Thermomixgerät bei 33° bzw. 40° C weiterinkubiert. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion, die aus den entsprechenden Abbildungen entnommen werden können, wurden jeweils 4 Proben entnommen, dreimal bei -30° C im Methanolbad eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und anschließend die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 3 000 UpM für 10 Minuten entfernt. In den Überständen wurden daraufhin die plaquebildenden Einheiten ermittelt. Die Plaqueteste wurden bei 33° C durchgeführt.

Die Ergebnisse sind für den Wildtyp in Abb. 2, für die ts-Mutante F 30/1 in Abb. 3 und für F 18/4 in Abb. 4 dargestellt. Aus dem Vergleich der Abbildungen ergibt sich, daß die Infektiositätstiter beim Wildtyp zu jedem Zeitwert ganz deutlich über denjenigen der ts-Mutanten lagen. Bei allen 3 Virustypen ist die relative Vermehrungsgeschwindigkeit jedoch bei 33° C in etwa gleich. Bei 40° C erfolgt im Gegensatz zum Wildtyp bei der ts-Mutante F 18/4 praktisch keine Vermehrung. Der geringgradige Anstieg der Infektiosität ist am ehesten mit dem Vorhandensein und der Vermehrung von wenigen Revertanten zu erklären. Bei der Mutante F 30/1 war auch bei der nicht-permissiven Temperatur ein Ansteigen der Infektiosität festzustellen, der zwar gering war im Verhältnis zum Wildtyp, jedoch nicht mit einem Durchbrechen von Revertanten zum Wildtyp zu erklären ist.

4. Virusvermehrung unter Temperatursprung-Bedingungen

Bei ts-Mutanten kann man durch Wechseln der Inkubationstemperatur während der Virusvermehrung von permissiven auf nicht-permissive Temperaturen bzw. umgekehrt, Hinweise auf den sensitiven Prozeß gewinnen. Wir haben daher derartige Experimente durchgeführt. Das Diagramm in Abb. 5 zeigt den entsprechenden Versuchsansatz. Die mit den ts-Mutanten infizierten Kulturgefäße wurden ent-

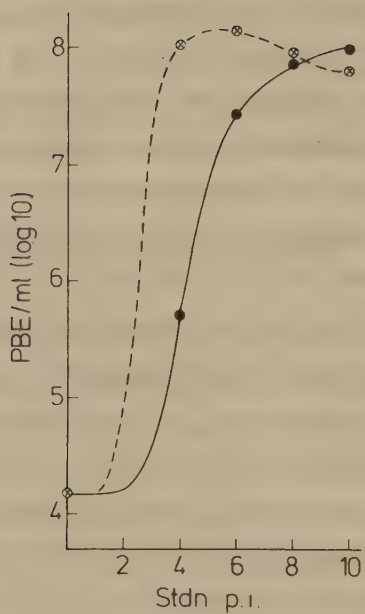


Abb. 2. Bildung von plaquebildenden Einheiten des
KP-Virus (Wildtyp) bei 33 und 40° C.

Experimentelle Einzelheiten siehe Seite 30.

Symbole: ●—● , ○---○ Inkubation bei 33 bzw. 40° C

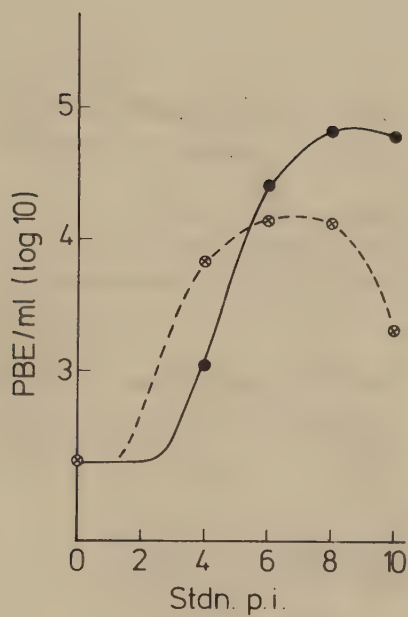


Abb. 3. Bildung von plaquebildenden Einheiten der *ts*-Mutante F 30/1 bei 33 und 40° C.

Experimentelle Einzelheiten siehe Seite 30.

Symbole: ● — ● , ⊗ --- ⊗ Inkubation bei 33 bzw. 40° C

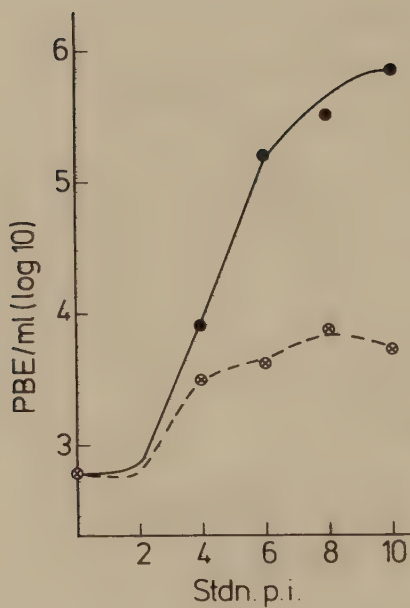


Abb. 4. Bildung von plaquebildenden Einheiten der ts-Mutante F 18/4 bei 33 und 40° C.

Experimentelle Einzelheiten siehe Seite 30.

Symbole: ●—●, ⊙---⊙ Inkubation bei 33 bzw. 40° C

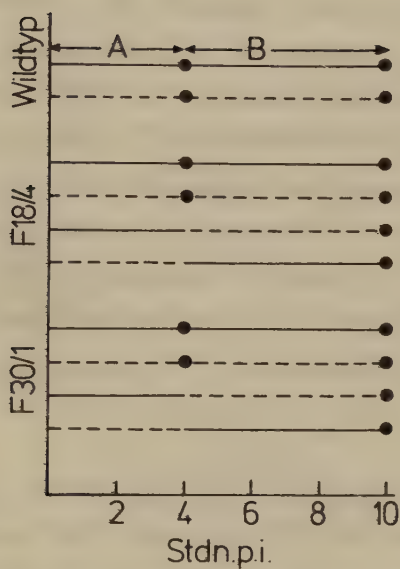


Abb. 5. Schematische Darstellung des Versuchsansatzes bei den Temperatursprung-Experimenten.

Symbole: ----- , ——— Inkubation bei 40 bzw. 33° C

● Probeentnahme

weder für 4 Stunden bei 33° C und dann für weitere 6 Stunden bei 40° C gehalten, oder umgekehrt für 4 Stunden bei 40° C und dann für 6 Stunden bei 33° C inkubiert. Entsprechende Kontrollen der Mutanten F 18/4 und F 30/1 sowie des Wildtyps blieben 10 Stunden bei 33° C oder 10 Stunden bei 40° C. Zum Zeitpunkt des Temperaturwechsels und am Schluß des Versuches (10 Stunden p.i.) wurden jeweils 4 Proben entnommen, wie bereits beschrieben aufgearbeitet und die PBE, HA-Einheiten sowie die Neuraminidase-Aktivitäten bestimmt. Die Abbildungen 6 - 14 zeigen die Ergebnisse.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen zunächst frühere Versuche, nach denen bei 40° C in den mit den ts-Mutanten infizierten Kulturen kein oder nur sehr wenig infektiöses Virus gebildet wird. Demgegenüber lassen sich unter diesen Bedingungen hämagglutinierende und Neuraminidase-Aktivitäten nachweisen. Die Werte der Neuraminidase-Aktivitäten lagen bei der Mutante F 18/4 höher als diejenigen der Mutante F 30/1, erreichten jedoch nicht diejenigen des Wildtyps. Das bedeutet, daß bei der nicht-permissiven Temperatur die beiden Komponenten der Virushülle zu einem bestimmten Grade gebildet werden.

Dieser Befund ließ sich auch durch Temperatursprung-Experimente erhärten. Werden die mit den ts-Mutanten infizierten Zellen zunächst für 4 Stunden bei 33° C und dann

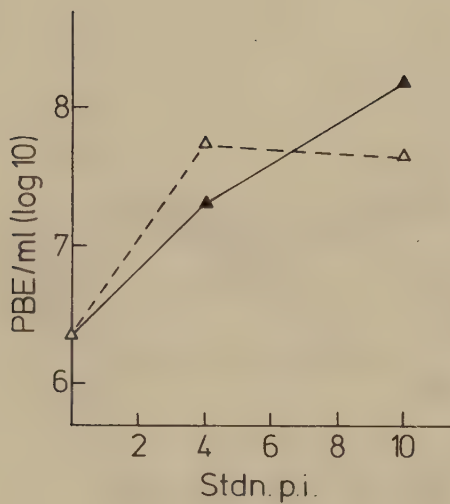


Abb. 6. Plaquebildende Einheiten des KP-Virus (Wildtyp)
beim Temperatursprung-Experiment (Kontrolle).

Einzelheiten siehe Abb. 5.

Symbole: $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, $\triangle$ --- $\triangle$ Inkubation bei 33 bzw. 40° C.

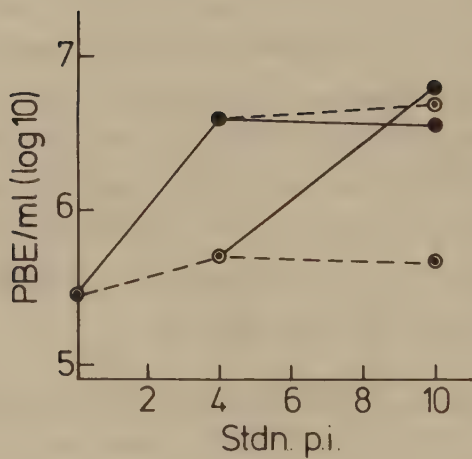


Abb. 7. Plaquebildende Einheiten der ts-Mutante F 18/4
beim Temperatursprung-Experiment.

Einzelheiten siehe Abb. 5.

Symbole: ●—● , ○---○ Inkubation bei 33 bzw. 40° C.

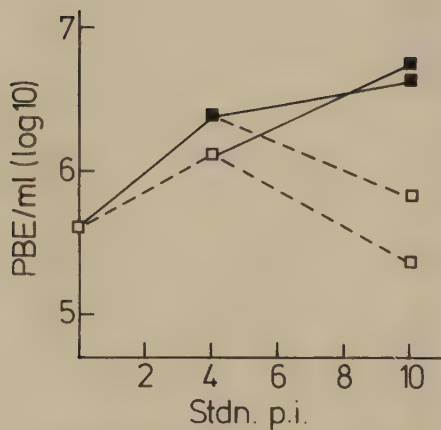


Abb. 8. Plaquebildende Einheiten der *ts*-Mutante F 30/1
beim Temperatursprung-Experiment.

Einzelheiten siehe Abb. 5.

Symbole: ■—■ , □---□ Inkubation bei 33 bzw. 40° C.

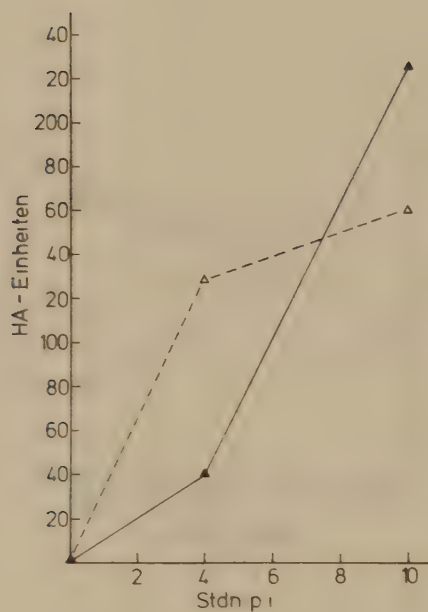


Abb. 9. Hämagglutinierende Einheiten des KP-Virus (Wildtyp) beim Temperatursprung-Experiment (Kontrolle).

Einzelheiten siehe Abb. 5.

Symbole: $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, $\triangle$ — $\triangle$ Inkubation bei 33 bzw. 40° C.

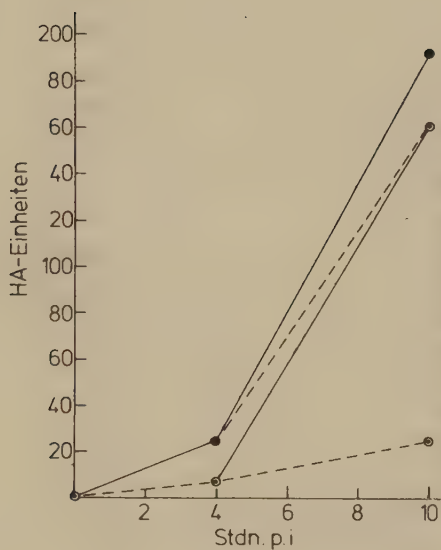


Abb. 10. Hämagglutinierende Einheiten der ts-Mutante F 18/4
beim Temperatursprung-Experiment.

Einzelheiten siehe Abb. 5.

Symbole: ●—● , ○---○ Inkubation bei 33 bzw. 40° C.

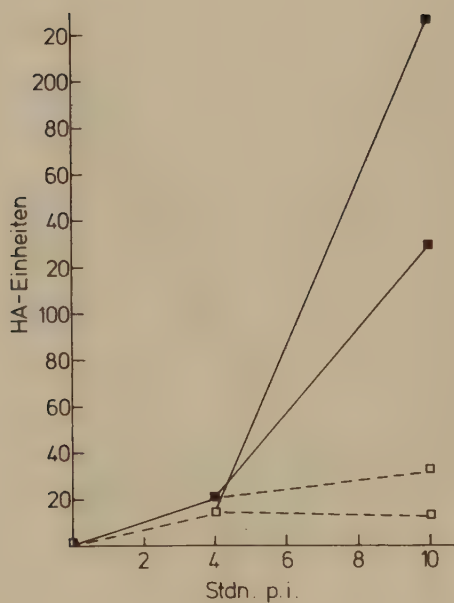


Abb. 11. Hämagglutinierende Einheiten der ts-Mutante F 30/1
beim Temperatursprung-Experiment.

Einzelheiten siehe Abb. 5.

Symbole: ■—■, □---□ Inkubation bei 33 bzw. 40° C.

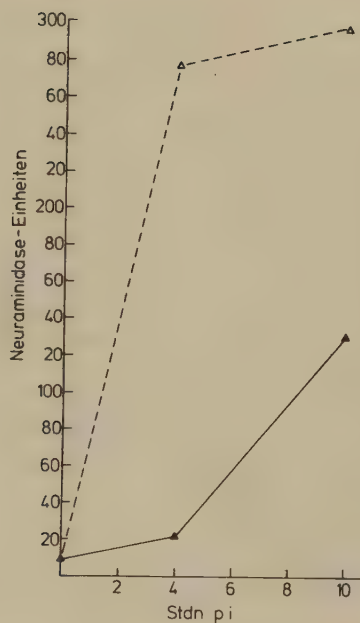


Abb. 12. Neuraminidase-Einheiten des KP-Virus (Wildtyp) beim Temperatursprung-Experiment (Kontrolle).

Einzelheiten siehe Abb. 5.

Symbole: $\blacktriangle \longrightarrow \blacktriangle$, $\triangle \dashrightarrow \triangle$ Inkubation bei 33 bzw. 40° C.

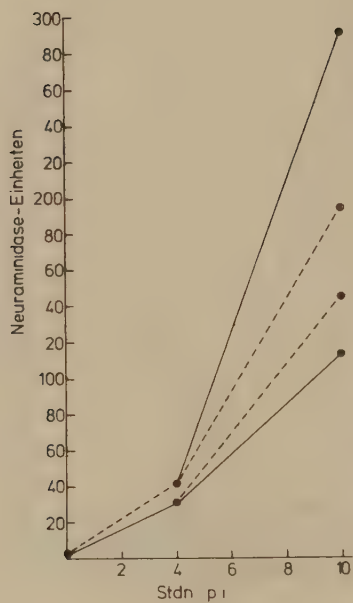


Abb. 13. Neuraminidase-Einheiten der ts-Mutante F 18/4
beim Temperatursprung-Experiment.

Einzelheiten siehe Abb. 5.

Symbole: ●—● , ○---○ Inkubation bei 33 bzw. 40° C.

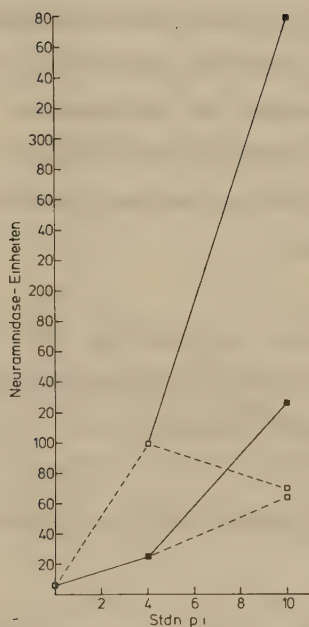


Abb. 14. Neuraminidase-Einheiten der ts-Mutante F 30/1
beim Temperatursprung-Experiment.

Einzelheiten siehe Abb. 5.

Symbole: ■—■ , □---□ Inkubation bei 33 bzw. 40° C.

für weitere 6 Stunden bei 40° C gehalten, steigen die bei 33° C gebildeten PBE nach dem Temperatursprung nicht weiter an. Demgegenüber nimmt die Anzahl von HA-Einheiten nach dem Temperaturwechsel bei der Mutante F 18/4 sehr deutlich und weniger stark bei der Mutante F 30/1 zu. Entsprechend verhalten sich die Neuraminidase-Aktivitäten der beiden ts-Mutanten.

Werden die ts-Mutanten zunächst bei 40° C und dann bei 33° C gehalten, steigen alle getesteten biologischen Aktivitäten nach dem Temperaturwechsel an.

5. Bildung von Virus-Polypeptiden bei verschiedenen Temperaturen

Die bisher durchgeführten Experimente haben einen ersten Hinweis dafür gegeben, daß nach Infektion mit beiden ts-Mutanten bei der nicht-permissiven Temperatur Virus-Hämagglutinin und Neuraminidase synthetisiert werden. Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese sollte nun geprüft werden, ob unter diesen Bedingungen auch die übrigen bekannten Polypeptide der Mutanten gebildet werden. Die Versuche wurden, wie in "Material und Methoden" angegeben, durchgeführt. Die erhaltenen Profile sind in den Abbildungen 15 und 16 wiedergegeben, wobei die Polypeptide wie üblich bezeichnet wurden. P steht für das größte Poly-

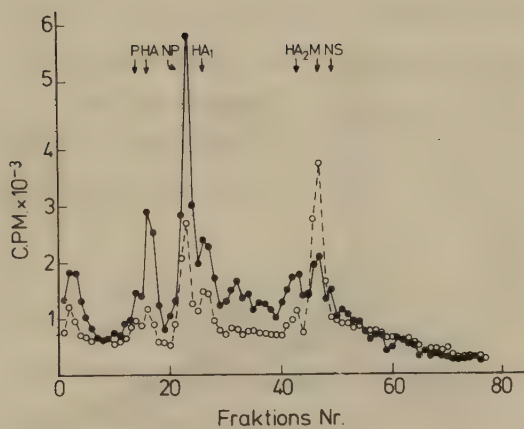


Abb. 15. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von F 18/4-infizierten Zellen.

Experimentelle Einzelheiten siehe Seiten 17-21.

Symbole: ●—● , ○---○ Inkubation bei 40 bzw. 33° C

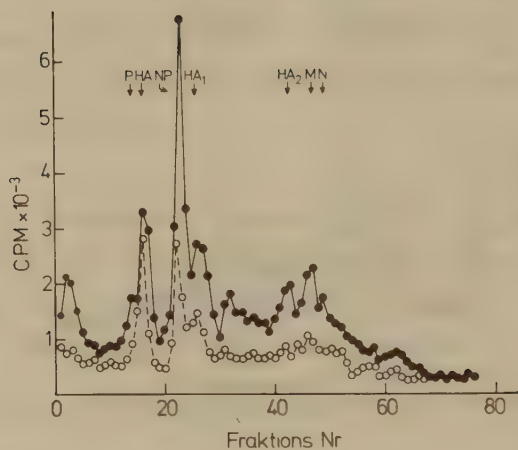


Abb. 16. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von F 30/1-infizierten Zellen.

Experimentelle Einzelheiten siehe Seiten 17-21.

Symbole: ● — ● , ○ — — ○ Inkubation bei 40 bzw. 33° C

peptid. Seine Funktion wird mit der Virus-Polymerase in Zusammenhang gebracht. HA, HA₁ und HA₂ sind die Glycoproteine des Hämagglutinins, NP ist das Protein des RNP-Antigens, M das nicht-glycosylierte Membran-Protein und NS (Nicht-Strukturprotein) ein virusspezifisches Protein, das nicht in das Viruspartikel eingebaut wird. Die Neuraminidase läßt sich beim KP-Virus nicht als ein distinkter Gipfel darstellen (Klenk et al., 1972).

Zum Vergleich wurde das Polyacrylamid-Gel-Profil vom Wildtyp aufgenommen (Abb. 17). Es zeigt das bekannte Bild und läßt erkennen, daß bei 40° C alle Polypeptide schneller gebildet werden als bei 33° C. Das trifft grundsätzlich auch für die Polypeptid-Muster der beiden ts-Mutanten zu, die nach Infektion bei 33° und 40° C erhalten wurden. Auffallend ist, daß bei der ts-Mutante F 18/4, bezogen auf die anderen Polypeptide, mehr M-Protein gebildet wird. Bei der ts-Mutante F 30/1 sind die Gipfel von HA₁ und HA₂ relativ niedrig.

Die mit Hilfe der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese erhaltenen Ergebnisse erweitern früher erhobene Befunde und besagen, daß die mit dieser Methode erfaßbaren Virus-Proteine auch von den mit ts-Mutanten infizierten Zellen bei der nicht-permissiven Temperatur synthetisiert werden. Der mutagene Block muß daher sehr spät im Vermehrungszyklus der Mutanten liegen.

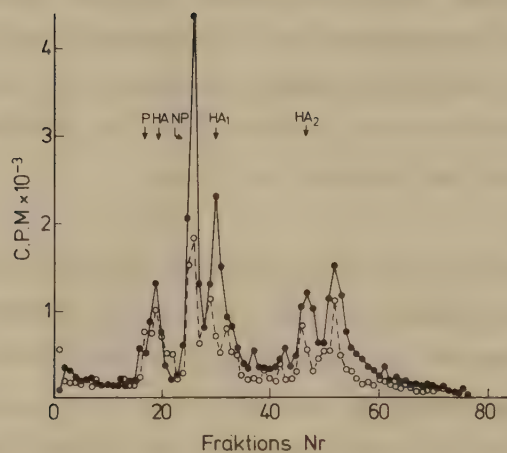


Abb. 17. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von KP-Virus
(Wildtyp)-infizierten Zellen.

Experimentelle Einzelheiten siehe Seiten 17-21.

Symbole: ●—● , ○---○ Inkubation bei 40 bzw. 33° C

6. Plauebildung in verschiedenen Wirtszellen

Ein großer Teil der Orthomyxoviren ist nicht in der Lage, in embryonalen Hühnerfibroblasten Plaques zu bilden, obwohl sie sich in diesen Zellen unter Bildung von infektiösen Viruspartikeln vermehren (Rott, pers. Mitteilung). Diese Viren produzieren jedoch in anderen Wirtszellen, wie z.B. in Zellen der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos, Plaques (Cursiefen, Manuskript in Vorbereitung). Wir versuchten daher einen Plaquetest bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur in diesen Zellen. Weiterhin benutzten wir für einen entsprechenden Versuch noch BHK-Zellen, da bereits eine Mutante des KP-Virus isoliert werden konnte (Záavada, 1969; Schwarz et al., 1972), die im Gegensatz zum Wildtyp in dieser Zellart Plaques produziert.

Die Plaqueteste wurden in analoger Weise durchgeführt wie diejenigen mit embryonalen Hühnerzellen und die Plaques nach 48 Stunden (40°C) bzw. 72 Stunden (33°C) angefärbt. Als Farbstoff diente bei BHK-Zellen Neutralrot und bei Zellen der Chorioallantoismembran Trypanblau. Zur Infektion wurde Virus benutzt, das bei 33°C im Hühnerei gebildet wurde.

In den BHK-Zellen konnten durch die beiden ts-Mutanten, wie durch den Wildtyp, bei 33 und 40° C keine Plaques gebildet werden. In den Zellen der Chorioallantoismembran wurden von beiden ts-Mutanten bei 33° C Plaques gebildet, die in ihrer Morphologie denjenigen des Wildtyps entsprachen. Bei 40° C konnten dagegen Plaques nicht eindeutig festgestellt werden.

7. Veränderung der Färbebedingungen für den Plaquetest

Voraussetzung für eine positive Plaquebildung ist ein deutlich ausgeprägter cytopathogener Effekt der infizierten Zellen, der eine Aufnahme von Vitalfarbstoffen nicht mehr erlaubt. Es ist denkbar, daß die Zellveränderungen, die von nicht-plaquebildenden Viren verursacht werden, nicht tiefgreifend genug und unter den gewählten Bedingungen daher nicht darstellbar sind. Wir versuchten daher eine Plaquebildung bei den ts-Mutanten unter Bedingungen zu erreichen, bei denen es möglich erschien, den cytopathogenen Effekt künstlich zu verstärken. Hierzu wurden embryonale Hühnerzellen, wie beschrieben, infiziert, mit dem allgemein benutzten agarhaltigen Medium überschichtet und bei 40° C für 48 Stunden inkubiert. Danach wurde wie üblich mit Neutralrot angefärbt, die Zellen jetzt jedoch für weitere 24 Stunden bei 4° C gehalten und dann erst ausgewertet.

Die so erhaltenen Ergebnisse sind aus Tab. 2 zu entnehmen. Daraus geht hervor, daß sich die beiden ts-Mutanten unterschiedlich verhielten. Während bei der Mutante F 18/4 auch nach dieser Prozedur keine Plaques festzustellen waren, wurden solche nach Inkubation nach 40° C bei der Mutante F 30/1 ganz deutlich bis zu einer 10⁶-fachen Verdünnung der infektiösen Eiflüssigkeit gesehen. Die Plaques waren im Gegensatz zum Wildtyp kleiner, hatten ein angefärbtes Zentrum und einen unklaren Rand (Ab. 18 u. 19). Die Plaquebildung war Dosis-abhängig. Bei höheren Konzentrationen brachen die durch Revertanten gebildeten Wildtyp-Plaques durch.

Tabelle 2

Anzahl der von den ts-Mutanten gebildeten Plaques bei 40° C nach verschieden langer Anfärbezeit mit Neutralrot

Verdünnungs- stufe (log 10)	Anzahl der Plaques			
	F 30/1		F 18/4	
	2 Std.*	24 Std.**	2 Std.**	24 Std.**
6	0	5	0	0
5	0	28	0	0
4	0	186	0	0
3	1 **	Z	0	3 **
2	2 **	Z	0	4 **
1	2 **	Z	1 **	3 **

* Anfärbezeit

** Plaque-Morphologie wie bei Wildtyp

Z Zellrasen zerstört durch konfluierende Plaques.

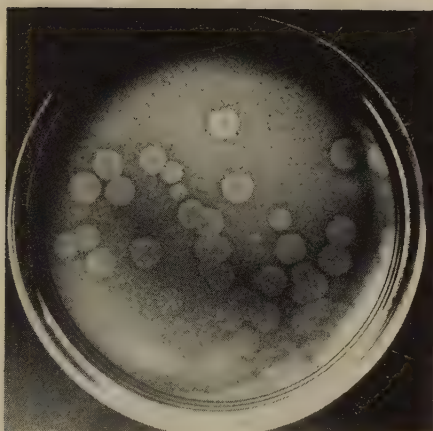


Abb. 18. Plaques des KP-Virus (Wildtyp) in embryonalen
Hühnerzellen nach 24 Std. langer Anfärbezeit
mit Neutralrot.

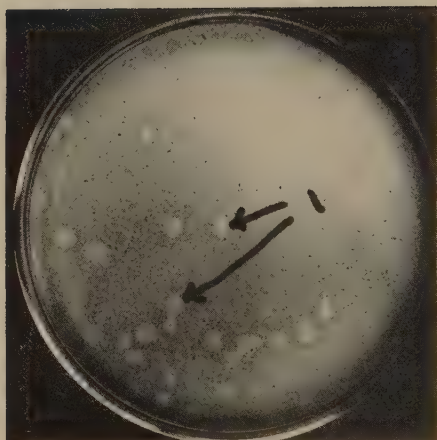


Abb. 19. Plaques der ts-Mutante F 30/1 in embryonalen Hühnerzellen nach 24 Std. langer Anfärbezeit mit Neutralrot.

VI. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Aufgabe dieser Arbeit war es, bei zwei von C. Scholtissek mit 5-Fluoruracil gewonnenen ts-Mutanten festzustellen, in welcher Phase der Virusvermehrung der mutagene Block liegt. Es wurde gefunden, daß bei beiden ts-Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur (40°C) in embryonalen Hühnerzellen im Prinzip alle erfaßbaren Viruskomponenten synthetisiert werden. In der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurden alle auch beim Wildtyp auftretenden Polypeptide in der entsprechenden Position des Gels gefunden. Wie zu erwarten, wurde bei gleicher Markierungszeit bei 33°C weniger Radioaktivität in die Virus-Proteine eingebaut als bei 40°C . Es war auffallend, daß bei der ts-Mutante F 18/4 relativ mehr M-Protein gebildet wird als beim Wildtyp und der Mutante F 30/1. Bei letzterer war die Synthese der Hämagglutinin-Glycoproteide HA_1 und HA_2 bei beiden Temperaturen relativ gering. Trotzdem die Viruskomponenten bei 40°C gebildet wurden, war bei dieser Temperatur die Bildung infektiöser Viruspartikel bei F 18/4 kaum meßbar und bei F 30/1 stark reduziert.

Aufgrund dieser Tatsache kann geschlossen werden, daß bei beiden Mutanten der Mutationsblock bei einem sehr späten Schritt der Virusvermehrung liegt. Unterschiede zwischen den beiden ts-Mutanten wurden bei Temperatursprung-Experimenten deutlich. Wurde die ts-Mutante F 18/4 für

4 Stunden bei der permissiven Temperatur gehalten, wurden bei anschließender Inkubation bei 40° C die normalen auch beim Wildtyp gefundenen Mengen an Hämagglutinin und Neuraminidase nachgewiesen. Anders verhielt sich die Mutante F 30/1, die nach Temperaturerhöhung keinen wesentlichen Anstieg der Virus-Aktivitäten zeigte. Daß die Infektiosität der beiden ts-Mutanten nicht gleichsinnig anstieg, dürfte auf die relative Temperatur-Labilität des KP-Virus zurückzuführen sein. Vergleichende Untersuchungen haben ergeben, daß die beiden ts-Mutanten die gleiche Temperatur-Labilität in vitro zeigen wie der Wildtyp.

Der wesentliche Unterschied bei beiden ts-Mutanten kam zum Ausdruck, als versucht wurde, den cytopathogenen Effekt durch verlängerte Anwendung eines photoaktiven Vitalfarbstoffes zu verstärken. Hier zeigte sich, daß auch durch diese Manipulation bei der Mutante F 18/4 bei 40° C keine Plaquebildung zu erzielen war. Im Gegensatz dazu traten bei der Mutante F 30/1 jetzt Plaques auf, die eine vom Wildtyp abweichende Morphologie aufwiesen. Das bestätigt zunächst eine frühere Beobachtung, daß letztere Mutante bei 40° C grundsätzlich, wenn auch langsamer, infektiöse Viruspartikel bildet. Die Mutante F 30/1 besitzt jedoch nur unvollkommen die Fähigkeit, Zellen bei der nicht-permissiven Temperatur abzutöten. Dieses Verhalten veränderte sich auch nicht, wenn andere Wirtszellen für

den Plaquetest verwendet wurden. Da ein großer Teil der Influenzaviren, wie z.B. humane Influenzastämme, in dem von uns benutzten System prinzipiell keine Plaques bilden, ist daran zu denken, daß hier ähnliche Verhältnisse vorliegen. Es sollte daher versucht werden, auch hier das von uns verwendete Verfahren anzuwenden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß bei der Mutante F 18/4 der mutagene Block bei der Maturation, möglicherweise durch eine überhöhte Produktion des Membran-Proteins M, liegt, während bei der Mutante F 30/4 die Wechselwirkung zwischen Virus und Wirtszelle so verändert ist, daß der cytopathogene Effekt nicht mehr voll zur Auswirkung kommt. Welche genetische Leistung dafür verantwortlich ist, läßt sich aufgrund unserer Ergebnisse noch nicht sagen.

Die Reversionsrate beider Mutanten zum Wildtyp ist zwar relativ niedrig, dürfte jedoch hoch genug sein, um den Organismus bei der hohen Virulenz des KP-Virus krank zu machen. Die beiden ts-Mutanten eignen sich daher sicher nicht zur Anwendung als Lebendimpfstoffe. In beiden Fällen würde möglicherweise ein zweiter ts-Mutationsblock zum Ziele führen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei mit Hilfe von 5-Fluoruracil gewonnene temperatur-sensitive Mutanten des Virus der Klassischen Geflügelpest wurden näher charakterisiert. Bei beiden Mutanten liegt der mutagene Block sehr spät im Vermehrungszyklus. Während bei der ts-Mutante F 18/4 die Virusreifung gestört ist, führt die Vermehrung der ts-Mutante F 30/1 zu keinem voll ausgeprägten cytopathogenen Effekt, so daß die Plaquebildung verhindert wird.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Bresch, C. und R. Hausmann (1972)

Klassische und Molekulare Genetik, 3. Auflage.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Caliguiri, L. A., H.-D. Klenk und P. W. Choppin (1969)

The proteins of the parainfluenza virus SV 5.

I. Separation of virion polypeptides by polyacrylamide gel electrophoresis.

Virology 39, 460-466.

Cursiefen, D.

Multiplication of animal viruses and plaque test in cells of the chorio-allantoic membrane of chicken embryo.

Manuskript in Vorbereitung.

Davenport, F. M., R. Rott und W. Schäfer (1960)

Biological properties of influenza virus components obtained after ether treatment.

J. Exp. Med. 112, 765-782.

Drzeniek, R. (1972)

Viral and bacterial neuraminidases.

Current Topics Microbiol. Immunol. 59, 34-74.

Drzeniek, R., J. T. Seto und R. Rott (1966)

Characterization of neuraminidase from myxoviruses.

Biochim. Biophys. Acta 123, 547-558.

Ghendon, Y. Z., S. G. Markushin, A. T. Marchenko,
B. S. Sitnikov und V. P. Ginzburg (1973)

Biochemical characteristics of fowl plague virus
ts-mutants.

Virology 55, 305-319.

Huang, R. T. C. und M. Orlich, (1972)

Substrate specificities of the neuraminidase of
Newcastle disease and fowl plague viruses.

Hoppe-Seyler's Z. für physiol. Chem. 353, 318-322.

Huang, R. T. C., R. Rott und H.-D. Klenk (1973)

On the receptor of influenza viruses.

1. Artificial receptor for influenza virus.

Z. Naturforsch. 28c, 342-345.

Klenk, H.-D. und R. Rott (1973)

Formation of influenza virus proteins.

J. Virol. 11, 823-831.

Klenk, H.-D., R. Rott und H. Becht (1972)

On the structure of the influenza virus envelope.

Virology 47, 579-591.

Klenk, H.-D., W. Wöllert, R. Rott und C. Scholtissek (1974)

Association of influenza virus proteins with cyto-
plasmic fractions.

Virology 57, 28-41.

Kraus, W. und W. Schäfer (1963)

Apparatur zur Herstellung von primären Kulturen
animaler Zellen

Zbl. Vet. Med. 10b, 394-399.

Mackenzie, J. S. (1970)

Isolation of temperature-sensitive mutants and the
construction of a preliminary genetic map for in-
fluenza virus.

J. Gen. Virol. 6, 63-75.

Mills, J. V. und R. M. Chanock (1971)

Temperature-sensitive mutants of influenza virus:
1. Behavior in tissue culture and in experimental
animals.

J. Infect. Dis. 123, 145-152.

Rott, R. (1974)

Functional significance of the various components
of the influenza virus.

Adv. Drug Res., im Druck.

Rott, R., H. Becht, H.-D. Klenk und C. Scholtissek (1972)

Interactions of Concanavalin A with the membrane of
influenza virus infected cells and with envelope
components of the virus particle.

Z. Naturforsch. 27b, 227-233.

Scholtissek, C. (1969)

Synthesis in vitro of RNA complementary to parental
viral RNA by RNA-polymerase induced by influenza virus.

Biochim. Biophys. Acta 179, 389-397.

Scholtissek, C. und R. Rott (1961)

Zusammenhänge zwischen der Synthese von Ribonucleinsäure und Protein bei der Vermehrung eines Virus der Influenza-Gruppe (Virus der Klassischen Geflügelpest).

Z. Naturforsch. 16b, 663-673.

Scholtissek, C. und R. Rott (1969a)

Ribonucleic acid nucleotidyl transferase induced in chick fibroblasts after infection with Newcastle disease virus.

J. Gen. Virol. 4, 565-570.

Scholtissek, C. und R. Rott (1969b)

Hybridization studies with influenza virus RNA.

Virology 39, 400-407.

Scholtissek, C. und R. Rott (1970)

Synthesis in vivo of influenza virus plus and minus strand RNA and its preferential inhibition by antibiotics.

Virology 40, 989-996.

Scholtissek, C., R. Drzeniek und R. Rott (1969)

"Myxoviruses" in: "The Biochemistry of Viruses".

Herausgeg. H. B. Levy. Marcel Dekker, New York und London, pp. 220-258.

Scholtissek, C., R. Kruczinna, R. Rott und H.-D. Klenk (1974)

Characteristics of an influenza mutant temperature sensitive for viral RNA synthesis.

Virology 58, 317-322.

Schwarz, R. T. und C. Scholtissek (1973)

Purification and properties of the RNA-polymerase-template complex of an influenza virus.

Z. Naturforsch. 28c, 202-207.

Schwarz, R., C. Scholtissek und R. Rott (1972)

Failure of rescue between influenza A viruses.

Med. Microbiol. Immunol. 158, 54-57.

Seto, J. T. und R. Rott (1966)

Functional significance of sialidase during influenza virus multiplication.

Virology 30, 731-737.

Simpson, R. W. und G. K. Hirst (1968)

Temperature-sensitive mutants of influenza A viruses. Isolation of mutants and preliminary observation on genetic recombination and complementation.

Virology 35, 41-49.

Skehel, J. J. (1973)

Early polypeptide synthesis in influenza virus infected cells.

Virology 56, 394-399.

Sugiura, A., K. Tobita und E. D. Kilbourne (1972)

Isolation and preliminary characterization of temperature sensitive mutants of influenza virus.

J. Virol. 10, 639-647.

Závada, J. (1969)

A host-cell DNA function involved in the replication of avian tumor viruses and fowl plague virus.

J. Gen. Virol. 4, 571-576.

Zimmermann, T. und W. Schäfer (1960)

Effect of p-fluorophenylalanine on fowl plague virus multiplication.

Virology 11, 676-698.

Fräulein A. Bowles, Fräulein M. Orlich und Frau
C. Ostermann danke ich für die technische Hilfe.

Mein Dank gilt auch allen Angehörigen des Institutes für Virologie für ihre Menschlichkeit und Hilfsbereitschaft.

Fräulein Rauja Schukre (B.Sc. Commerce), Herrn
A. Abdulkader (B.Sc. Vet. Med.) und Herrn A.
Mallahi (B.Sc. Eng.) danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

Die Arbeit wurde durch Mittel des Sonderforschungsbereiches 47 (Virologie) gefördert.

Lebenslauf

Als Sohn des Englisch-Lehrers Schukre Schubaers und seiner Ehefrau Laila Schurrah wurde ich am 23.5.48 in Khanyuniß, Gazastreifen, geboren. Die Schule besuchte ich von 1953 bis 1964 in Khanyuniß und schloß die Ausbildung mit dem "General Secondary Examination Certificate" ab. Danach besuchte ich die Universität in Kairo und studierte dort 11 Semester Veterinärmedizin bis Januar 1970. Das Studium beendete ich mit der Abschlußprüfung zum Bachelor Vet. Med.

Im September 1971 besuchte ich den deutschen Sprachkurs für Ausländer am Goethe-Institut in Schwäbisch Hall und Iserlohn. Seit dem Wintersemester 1972 studiere ich Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität Gießen. Zur selben Zeit begann ich mit meinen Arbeiten für meine Inaugural-Dissertation.

Lebenslauf

Als Sohn des hochverehrten Ehepaares ...
wurde ich am 11. 1. 1925 in ...
geboren. Ich besuchte die ...
als ...
...
...
...
...
...
...
...
...

Im September 1941 wurde ich ...
...
...
...
...
...
...
...
...

